

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/DE05/000589

International filing date: 29 March 2005 (29.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 054 730.0
Filing date: 05 November 2004 (05.11.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 October 2005 (21.10.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 054 730.0

Anmeldetag: 05. November 2004

Anmelder/Inhaber: Novosom AG, 06120 Halle/DE

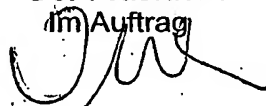
Bezeichnung: Serumstabile amphotere Liposomen

Zusatz: zu DE 10 2004 016 020.1

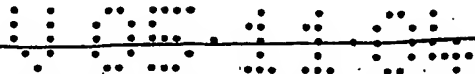
IPC: A 61 K, C 12 N, B 01 J

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. Oktober 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
im Auftrag



Wallner



3

Deutsche Patentanmeldung - Serumstabile amphotere Liposomen.

Stand der Technik

Eine recht neue Klasse von potentiellen pharmazeutischen Wirkstoffen stellen die sogenannten kurzen interferierenden Ribonukleinsäuren (siRNA) dar, die als Doppelstrang eingesetzt werden, um einzelne Gene gezielt in ihrer Aktivität herunterzuregulieren oder auszuschalten. Ihr großes Potential in Therapie und Diagnostik ist leider mit dem Nachteil der starken Instabilität gegenüber Körperflüssigkeiten verbunden. Insbesondere im Blut werden kleine Nukleinsäuren sehr rasch abgebaut. Durch chemische Modifizierung der Nukleinsäuren wird versucht die Empfindlichkeit dieser Moleküle herabzusetzen, was als Nachteil oft eine verringerte bis fehlende biologische Aktivität zur Folge haben kann.

Ein anderer Ansatz ist die Verwendung eines Trägers, der die siRNA vor Angriffen von Enzymen schützt und zum Wirkort transportieren kann. Liposomen werden schon seit einiger Zeit als pharmazeutischer Träger für Arzneistoffe eingesetzt.

Zahlreiche Publikationen beschäftigen sich mit der Anwendung von meist kationischen liposomalen Systemen zum intrazellulären Delivery von Oligonukleotiden in vivo (z.B. Molecular Membrane Biology, 16, 129-140, (1999); BBA 1464, 251-261, (2000); Reviews in Biology and Biotechnology, 1(2), 27-33, (2001). All diesen Systemen gemein ist jedoch die Tatsache, dass die verwendeten Lipid-Mischungen aus ungesättigten und kationischen Lipiden wie z.B. DOTAP und/oder DOPE aufgebaut sind und aus diesem Grund nicht serumstabil sind. Dadurch bedingt setzen diese Liposomen eingeschlossenen Wirkstoff sehr schnell nach einer parenteralen Applikation frei. Häufig werden für die oben genannten Anwendungen auch Komplexe aus vorgeformten Liposomen und Nukleinsäuren hergestellt (z.B. Lipoplexe). Die Komplexbildung bzw. die meist nicht im Serum stabilen liposomalen Formulierungen führen dazu, dass die Stabilität der Oligonukleotide über einen längeren Zeitraum, nicht gewährleistet ist.

Amphotere Liposomen sind eine neue Klasse von Liposomen, die vorteilhafte Eigenschaften gegenüber konventionellen Liposomen und rein kationischen Systemen für ein intrazelluläres Delivery bieten. Negativ geladene Wirkstoffe, wie die Nukleinsäuren lassen sich effektiv in das Innere dieser Liposomen verpacken, obwohl die Gesamtladung der Liposomen bei physiologischem pH negativ bleibt. Durch Änderung des Umgebungs-pH, wie er bei der endosomalen Aufnahme von Liposomen in Zellen vorkommt, von neutral nach leicht sauer, ändert sich auch die Ladung der amphoteren Liposomen von anionisch nach leicht kationisch und die Vorteile eines kationischen Transfektionsreagenzes werden ausgenutzt. In der WO 02/66012 A2 sind diese Liposomen erstmals beschrieben. Die WO 02/66490 und WO 02/66489 (WO 03



4

070220 & WO 03 070735) stellen pH-sensitive Lipide vor, die sich zum Aufbau von amphoteren Liposomen eignen.

Bei systemischer Applikation ist neben den üblichen Bedingungen für parenterale Applikation, wie Sterilität, Isoosmolarität, Reinheits- und Toxizitätsanforderungen, die Stabilität einer liposomalen Formulierung in humanem Serum eine Voraussetzung für ein erfolgreiches Zulassungsverfahren. So sehen auch die Richtlinien der US-amerikanischen Aufsichtsbehörde FDA für liposomale Formulierungen (<http://www.fda.gov/oc/erguance/index.htm>, Liposome Drug Products) besondere Prüfungen vor. Dabei wird verlangt, dass das Verhältnis verkapselter zu freiem Arzneistoff in vitro, sowie in vivo über den Zeitraum der Zirkulation zu bestimmen ist.

Serumkomponenten können die liposomale Membran permeabilisieren und Wirkstoff freisetzen. Ob ein Wirkstoff schnell, langsam oder nicht freigesetzt wird, hängt auch von den molekularen Dimensionen des Wirkstoffes ab. So verbleibt ein Plasmid mit mehreren tausend Basenpaaren eher im Liposom als kleine Oligonucleotide. Für ein intrazelluläres Delivery ist es wesentlich, dass die Freisetzung möglichst gering ist.

20

Beschreibung der Erfindung

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die in der WO 02/66012 A2 offenbarten amphoteren Liposomen sich stark in ihrer Serumstabilität bei Verwendung von kleinen Oligonukleotiden unterscheiden. Ziel der vorliegenden Erfindung ist es daher, Formulierungen von amphoteren Liposomen bereitzustellen, die kleine Oligonukleotide, wie siRNA und/oder Antisense-Moleküle, in ihren Innenraum einschließen und unter Serumbedingung nicht, oder nur zu einem kleinen Teil freisetzen und sich somit zur parenteralen Gabe eignen.

30

Die für diese Ausführung der Erfindung relevanten Oligonukleotide sind aus 5-100, bevorzugt aus 5-40 und besonders bevorzugt aus 10-25 Nukleotiden oder Basenpaaren aufgebaut. Darüberhinaus können die Oligonukleotide als Einzelstrang (z.B. Antisense-Oligonukleotide), als Doppelstrang (z.B. small-interfering RNA, Decoy-Oligonukleotide) oder in komplexer Faltung (z.B. Aptamere, Spiegelmer, Ribozyme) vorliegen. Alle für diese Erfindung relevanten Oligonukleotide sind aus Desoxyribonukleotiden oder aus Ribonukleotiden sowie aus deren chemisch-modifizierten Derivaten aufgebaut, wie beispielsweise Phosphorothioate DNA (PS), 2'-O-methyl RNA (OME), 2'-O-methoxy-ethyl RNA (MOE), Peptide nucleic acid (PNA), N3'-P5' Phosphoroamidate (NP), 2'-fluoro-arabino nucleic acid (FANA), Locked nucleic acid (LNA), Morpholino phosphoroamidate (MP), Cyclohexene nucleic

acid (CeNA), Tricyclo-DNA (tcDNA)). Darüber können Copolymere und Block-Copolymere verschiedener Nukleotide und sogenannte Gapmere in die Liposomen eingeschlossen werden.

5 In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung werden Aptamere oder Spiegelmere in die Liposomen eingeschlossen.
Aptamere sind DNA- oder RNA-basierte Oligonukleotide mit komplexer dreidimensionaler Struktur. Aufgrund dieser Struktur können Aptamere sehr spezifisch und hochaffin an Proteintargets binden und wirken somit
10 therapeutisch, meist extrazellulär. Ihre Funktionalität ist nahezu identisch zu monoklonalen Antikörpern.

Spiegelmere sind im Gegensatz zu D-Oligonukleotiden aus L-Ribose- und L-2'-Desoxyribose-Einheiten aufgebaut. Genau wie Aptamere binden diese spiegelbildlichen Nukleinsäuren spezifisch an Proteintargets. Aufgrund der chiralen Inversion besitzen Spiegelmere im Gegensatz zu herkömmlichen D-Oligonukleotiden eine erhöhte Stabilität gegenüber einem enzymatischen Abbau.

20 Das Grundgerüst der erfindungsgemäßen amphoteren Liposomen wird von neutralen Gerüstlipiden gebildet, die einen Anteil an der Membran von mindestens 15mol%, bevorzugt von mehr als 25mol% und weiter bevorzugt von mehr als 35 mol% und höchstens 65 mol% besitzen. Geeignete Lipide sind Phosphatidylcholine, wie DMPC, DPPC, DSPC, DOPC und POPC, die sowohl synthetischen als auch natürlichen oder halbsynthetischen Ursprungs sein
25 können.

Es ist dem Fachmann bekannt, dass sich die Serumstabilität von Liposomen durch Zusatz von Cholesterol in der Membran erhöhen läßt. Dies wurde auch für amphotere Liposomen gefunden. Die erfindungsgemäßen Liposomen besitzen
30 vorzugsweise einen Gehalt von 30 bis 50mol%, bevorzugt von 35 - 45 mol% Cholesterol in der Membran.

Viele Lipide, die als Ladungsträger für amphotere Liposomen verwendet werden können, leiten sich von der chemischen Grundstruktur des Cholesterol ab (beispielsweise die offenbarten Verbindungen in WO 02/66490 und WO
35 02/6648).

Überraschenderweise wurde gefunden, dass diese Cholesteroldereivate im Allgemeinen, besonders MoChol, HisChol, Chems, HistChol nicht die stabilisierende Wirkung des nativen Cholesterol besitzen, daher ist es von Vorteil, wenn die Summe aller sterolbasierenden Lipide 55 mol% nicht
40 übersteigt.

Das amphotere Ladungsverhalten kann auf zwei Weisen gebildet werden: durch Verwendung von amphoteren Lipiden oder durch geeignete Mischungen von pH-sensitiven kationischen und anionischen Lipiden, wie sie in der WO 02 066012 offenbart werden. Werden amphotere Lipide verwendet, so beträgt der Membranteil zwischen 5 und 30 mol%, weiter bevorzugt zwischen 10 und 25%, bei Mischungen beträgt der Gesamtladungsträgeranteil bevorzugt nicht mehr als 50mol%, weiter bevorzugt zwischen 20 und 40mol%.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden amphotere Formulierungen wie folgt zusammengesetzt:

- Grundlipid ausgewählt aus der Gruppe DMPC, DPPC, DSPC mit 25 bis 65 mol%
- Cholesterol, mit 35 - 45 mol%
- amphoterer Lipid, ausgewählt aus der Gruppe: HistChol, HistDG, isoHistSuccDG, Acylcarnosin, HCChol.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Formulierungen wie folgt zusammengesetzt:

- Grundlipid ausgewählt aus der Gruppe DMPC, DPPC, DSPC mit 25 bis 65 mol%
 - Cholesterol, mit 35 - 45 mol%
 - Mischung kationischer und anionischer Lipide, davon mindestens eines pH-sensitiv, ausgewählt aus den Gruppen:
 - a) kationisch: DMTAP, DPTAP, DOTAP, DC-Chol, MoChol, HisChol, DPIM, CHIM, DORIE, DDAB, DAC-Chol, TC-Chol, DOTMA, DOGS, C(18)2Gly+N,N-di-octadecylamidoglycin, CTAP, CpyC, DODAP, und DOEPC.
 - b) anionisch: DGSucc, DMPS, DPPS, DOPS, POPS, DMPG, DPPG, DOPG, POPG, DMPA, DPPA, DOPA, POPA, Chems und CetylP
- mit Anteil an der liposomalen Membran von höchstens 40 mol%.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Formulierung und ihre Zusammensetzung ausgewählt aus folgender Tabelle:

Zusammensetzung	Molare Verhältnisse
DMPC/MoChol/DMPS/Chol	40:10:10:40
DMPC/AC/Chol	50:10:40
DMPC/HistChol/DPPS/Chol	35:10:15:40
DMPC/IsohistsuccDG/Chol	50:10:40
DMPC/MoChol/DGSucc/Chol	35:10:15:40
DMPC/MoChol/DGSucc/Chol	40:10:10:40
POPC/MoChol/DGSucc/Chol	35:10:15:40
DMPC/HistChol/Chol	50:10:40
POPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40

DMPC/Hist-DG/Chol	50:10:40
DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40
POPC/MoChol/DPPS/Chol	40:10:10:40
DPFC/DOTAP/DG-Succ/Chol	20:10:30:40
DPPC/HistChol/Chol	50:10:40
DPPC/HistDG/Chol	40:20:40
DPPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40
POPC/HcChol/Chol	50:15:35
DPPC/HcChol/Chol	50:15:35
POPC/AC/Chol	50:15:35
DPPC/AC/Chol	50:15:35
DPPC/HistChol/Chol	50:15:35
POPC/HistChol/Chol	50:15:35
POPC/HistSuccDG/Chol	50:15:35
DPPC/IsoHistSuccDG/Chol	50:15:35
POPC/IsoHistSuccDG/Chol	50:15:35
DPPC/HistSucc/Chol	50:15:35
POPC/MoChol/Chems/Chol	40:10:10:40
POPC/DOTAP/Chems/Chol	30:10:20:40
DMPC/HisChol/DGSucc/Chol	40:10:10:40
POPC/HisChol/Chems/Chol	40:10:10:40
DMPC/MoChol/Chems/Chol	40:10:10:40
POPC/MoChol/DGSucc/Chol	30:20:10:40

Für eine Verwendung der erfindungsgemäßen Formulierungen als Arzneimittelträger kann es zweckmäßig sein, Substanzen, die die Haltbarkeit erhöhen, die zur Regulierung des osmotischen Drucks dienen, zuzusetzen.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Liposomen kann durch Verfahren nach dem Stand der Technik erfolgen, wie beispielsweise Extrusion durch Membranen definierter Porengröße, Ethanolinjektion oder
10 Hochdruckhomogenisation. Beispielhafte Ausführungen sind in den Beispielen gegeben.

Nicht eingeschlossener Wirkstoff wird abgetrennt. Dazu werden geeignete Trennverfahren verwendet, so dass der Wirkstoff zu mindestens 90% im
15 Liposom eingeschlossen ist und weniger als 10% des Wirkstoffes sich ausserhalb des Liposoms befinden. Hierfür können chromatographische Verfahren, Zentrifugation, Dialyse oder Ultrafiltration verwendet werden.

4 05 1 104

8

Deutsche Patentanmeldung - Serumstabile amphotere Liposomen

Die erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen können zur therapeutischen Behandlung eines Säugetieres verwendet werden. Auch zur therapeutischen Behandlung von Menschen können sie verwendet werden.

Insbesondere zur parenteralen Applikation, bevorzugt zur intravenösen

5 Applikation sind die erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen geeignet.

Anschließend wird die Erfindung an Beispielen weiter erläutert, ohne auf diese Ausführungen begrenzt zu sein.

10

Abkürzungen:

	DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
	DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
	DSPC	Distearoylphosphatidylcholin
5	POPC	Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholin
	DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
	DOPG	Dioleoylphosphatidylglycerol
	POPG	Palmitoyl-oleoylphosphatidylglycerol
	DMPG	Dimyristoylphosphatidylglycerol
10	DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
	DMPS	Dimyristoylphosphatidylserin
	DPPS	Dipalmitoylphosphatidylserin
	DOPS	Dioleoylphosphatidylserin
	POPS	Palmitoyl-oleoylphosphatidylserin
	DMPA	Dimyristoylphosphatidic acid
	DPPA	Dipalmitoylphosphatidic acid
	DOPA	Dioleoylphosphatidic acid
	POPA	Palmitoyl-oleoylphosphatidic acid
	Chems	Cholesterolhemisuccinat
20	DC-Chol	3-β-[N-(N',N'-dimethylethane) carbamoyl]cholesterol
	CetylP	Cetylphosphat
	DODAP	(1,2)-dioleoyloxypropyl)-N,N-dimethylammonium chloride
	DOEPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholin
	DAC-Chol	3-β-[N-(N,N'-dimethylethane) carbamoyl]cholesterol
25	TC-Chol	3-β-[N-(N',N', N'-trimethylaminoethane) carbamoyl] cholesterol
	DOTMA	(1,2-dioleyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammoniumchlorid)
		(Lipofectin®)
	DOGS	((C18) ₂ GlySper3 ⁺) N,N-dioctadecylamido-glycyl-spermin
		(Transfectam®)
30	CTAB	Cetyl-trimethylammoniumbromid,
	CPyC	Cetyl-pyridiniumchlorid
	DOTAP	(1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium Salz
	DMTAP	(1,2-dimyristoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium Salz
35	DPTAP	(1,2-dipalmitoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium Salz
	DOTMA	(1,2-dioleyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid)
	DORIE	(1,2-dioleyloxypropyl)-3 dimethylhydroxyethyl ammoniumbromid)
	DDAB	Dimethyldioctadecylammonium bromid
	DPIM	
40	CHIM	Histaminyl-Cholesterolcarbammat
	MoChol	4-(2-Aminoethyl)-Morpholino-Cholesterolhemisuccinat

005.1104

10

Deutsche Patentanmeldung - Serumstabile amphotere Liposomen

- HisChol Histaminyl-Cholesterolhemisuccinat.
- HCChol N α -Histidinyl-Cholesterolcarbamat
- HistChol N α -Histidinyl-Cholesterol-hemisuccinat.
- AC Acylcarnosin, Stearyl- & Palmitoylcarnosin
- 5 HistDG 1,2-Dipalmitoylglycerol-hemisuccinat-N α -Histidinyl-
hemisuccinat, & Distearoyl-, Dimyristoyl, Dioleoyl or palmitoyl-
oleoylderivatives
- IsoHistSuccDG 1,2-Dipalmitoylglycerol-O α -Histidinyl-N α -hemisuccinat, &
- 10 Distearoyl-, Dimyristoyl, Dioleoyl or palmitoyl-oleoylderivatives
- DGSucc 1,2-Dipalmitoylglycerol-3-hemisuccinat & Distearoyl-,
dimyristoyl- Dioleoyl or palmitoyl-oleoylderivatives

U 05 11 04

MA

Deutsche Patentanmeldung - Serumstabile amphotere Liposomen

Abbildungen

Abbildung 1: Chemische Formeln von Lipiden

5 Abbildung 2: Belegung einer 96-well Mikrotiterplatte für den
Serumsstabilitätstest, gemessen wird die Freisetzung des Fluoreszenzmarkers
CF

10 Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme neben einer
Phasenkontrastaufnahme zur Zelllokalisierung.

Deutsche Patentanmeldung - Serumstabile amphotere Liposomen

Beispiel 1

Herstellung von amphoteren Liposomen

Ein Gemisch aus den in Tabelle 1 benannten Lipiden wird in den angegebenen molaren Verhältnissen in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet.

Der Lipidfilm wird mit 10mM Hepes, 150mM NaCl, pH 7.5 versetzt, dass eine 100mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Rotieren hydratisiert und für weitere 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird die Lösung eingefroren.

Nach dem Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 400nm extrudiert.

CF - (Carboxyfluorescein) - gefüllte Liposomen

Die Herstellung erfolgt analog dem Voranstehenden, nur wird zur Hydratation des Lipidfilms eine Lösung des Farbstoffes verwendet, nach: 500 mg CF werden in 130 µl 5 M NaCl, 12,5 ml 10 mM Hepes pH 7,5 und 630 µl 5 N NaOH gelöst. Der pH-Wert wird kontrolliert und gegebenenfalls nachgestellt (auf pH 7,5).

Die Abtrennung des nicht eingeschlossenen CF erfolgt über Gelfiltration.

20

Beispiel 2:

Einschluss von Cy5.5 anti CD40 ODN (floereszenzmarkiertes Antisense-Oligonukleotid) in amphotere Liposomen

Eine Lipidmischung folgender Zusammensetzung. DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol 40:10:10:40 (mol%) wird bei 50°C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet.

Der Lipidfilm wird mit soviel Cy5.5-anti-CD40-ODN (Antisense-Oligonukleotid) (150 µg/ml in 10 mM NaAcetat, 300 mM Sucrose, pH 4,5) versetzt, dass eine 15 mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Schwenken hydratisiert und für weitere 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird die Suspension eingefroren. Es folgen 3 Einfrier- und Auftauprozesse, wobei nach dem Auftauen jeweils eine 5-minütige Behandlung im Ultraschallbad erfolgt.

Nach dem letzten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 200nm oder 400nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite von 200 oder 400nm). Nach der Extrusion wird durch Zugabe einer 1mol/L HEPES-Stammlösung ein pH von 7,5 eingestellt.

Der Anteil des eingeschlossenen Cy5.5-anti-CD40-ODN (Antisense-Oligonukleotid) wird nach Abtrennung des frei vorliegenden Wirkstoffes

durch dreimalige Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 60000 x g über 45 min fluoreszenzspektroskopisch ermittelt.

Die Einschlusseffizienz des Oligonukleotids wird durch Bestimmung des Lipidgehaltes und der fluorimetrischen Cy5.5-Bestimmung im Verhältnis zu
5 zum Materialeinsatz von Lipid und ODN gesehen und beträgt für die Formulierung 53%.

Beispiel 3

10 Bestimmung der Serumstabilität.

Als Modellwirkstoff wird Carboxyfluorescein (CF) eingesetzt, der wie Oligonukleotide bei physiologischem pH negativ geladen ist. Die Serumstabilität der CF-gefüllten Liposomen wird über den Zeitraum von
15 insgesamt 24 h bei 37°C beobachtet. Es wird dabei die Freisetzung des CF aus den Liposomen über die Zeit per Fluoreszenzmessung beobachtet. Es können 3 verschiedene Liposomenformulierungen pro 96-well-Platte getestet werden. Zur Bestimmung der prozentual freigesetzten Menge an CF wird die in Puffer inkubierte Probe sowohl direkt vermessen (Basiswert) als auch nach
20 Öffnung der Liposomen durch Zugabe von Triton (Tritonwert oder 100%-Wert). In einem Gesamtvolumen von 500 µl werden sterilfiltriertes Serum und 1 mM Liposomen zusammengegeben. Derselbe Ansatz wird als Kontrolle mit Puffer anstelle des Serums vorbereitet.

25 Eine 96-well-Platte wird folgendermaßen vor den jeweiligen Probennahmen vorbereitet: in die Wells einer Zeile, Spalten 1, 3, 5, 7, 9 und 11 werden jeweils 5 µl Puffer (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5) vorgelegt. In die Spalten 2, 4, 6, 8, 10 und 12 jeweils 5 µl 10 % Triton X-100.

Die 96-well-Platte wird wie in Figure 2 dargestellt belegt. In die Spalten
1-6 werden je 5 µl der in Puffer inkubierten Liposomen gegeben, in die Spalten 7-12 die in Serum inkubierten. Zu den 5 µl Probe plus 5 µl Puffer bzw. Triton werden 290 µl Puffer gegeben. Es wird jeweils wieder ein Basis- und ein Triton-Wert genommen. Auf diese Weise kann man drei Formulierungen über 8 Zeitpunkte pro Platte testen. Die Zeitpunkte sind die folgenden:
35 null, null, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 5 h, 24 h.

Für die Messungen der Fluoreszenz wird ein Plattenreader mit 485/530 nm Filtern verwendet. Aus den gemessenen Fluoreszenzdaten werden die relativen Freisetzungswerte errechnet, indem der Tritonwert 100% Freisetzung entspricht. Tabelle 1 zeigt eine Reihe von getesteten Formulierungen. Es
40 zeigt sich, dass nur erfindungsgemäße Zusammensetzungen eine hohe Serumstabilität besitzen.

Deutsche Patentanmeldung - Serumstabile amphotere Liposomen

Beispiel 4

Einschluß von FITC-ODN (fluoreszenzmarkierte Antisense-DNA)

Das verwendete Antisense-Oligonukleotid (ODN) ist ein 18-mer Phosphorothioat mit einer FITC-Markierung am 5'-Ende (Fluorescein-
5 isothiocyanat). Liposomen mit FITC-ODN wurden hergestellt: 0,5 ml einer 1 mM Lipidlösung mit 9 µg ODN. Zwei Ansätze mit unterschiedlichem Verhältnis der kationischen Lipiden zu anionischer ODN: 3:1 und 4,5:1

- Jeweils DPPC/DOTAP/DG-Succ/Chol 20/10/30/40

-Hydratisierungs- bzw. ODN-Lösung: 10 mM NaAc pH 4,5, 300 mM Sucrose

10 - Zur Abtrennung nicht eingeschlossenen ODNs wurden die Liposomen in einem diskontinuierlichen Sucrosegradienten mit 0, 0,8 und 1,2 M Sucrose in Hep¹⁰, NaCl¹⁵⁰ flotiert.

Bestimmung des Einbaus an FITC-ODN aus der Summe der gemessenen FITC-ODN -
Fluoreszenzen (100 %) bzw. des Input und daraus abgeleitet dem Verhältnis von freier zu eingebauter Fluoreszenz:

%	Liposomen	Lipo-Reste	Puffer/Sucr.	freie ODN	gesamt.
3:1	43,3	14,7	5,4	36,6	100,0
4,5:1	46,3	10,7	4,5	38,5	100,0

15

Beispiel 4

Einschluß von siRNA (anti GFP) in amphotere Liposomen

Als Ladungsverhältnis von kationischem Lipid zu anionischer siRNA wird 5:1 bis 10:1 gewählt. Die siRNA (in 10 mM Hepes, 10 mM NaCl pH 7,2) wird mit dem Hydratisierungspuffer (10 mM NaAcetat, 10 mM NaCl, 280 mM Sucrose, pH 4,5) vermischt und auf den Lipidfilm gegeben, sodass eine 5-10 mM Lipidsuspension entsteht. Die Lipide werden durch Ultraschallbehandlung von der Kolbenwand gelöst (max. 10 min). Hydratisiert wird für 15 min bei Raumtemperatur (POPC als Trägerlipid, bzw. bei 50 °C bei DMPC, DPPC als Trägerlipid). Es folgt ein mindestens dreimaliges Einfrieren bei -70 °C (10 min für 1 ml Volumen, 30 min für Volumina bis 15 ml) und wieder Auftauen im Wasserbad (Temperatur wie beim Hydratisieren).

Der Kolben wird aufgetaut und bei größeren Volumina werden 3 ml der Lösung entnommen (in 8 ml Glasröhrchen). Der restliche Ansatz wird wieder bei -70 °C eingefroren. Die Extrusion erfolgt durch 100 nm-Filter. Anschließend wird der pH Wert mit 1/10 Volumen 1 M Hepes auf pH 8,0 eingestellt.

Flotation der Liposomen:

Die Liposomen Fraktionen werden mit dem selben Volumen 2,4 M Sucrose in H₂O versetzt (d.h. es entsteht eine 1,2 M Lösung). Den Gradienten schichtet man mit Puffer (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5), darunter 0,8 M Sucrose in Puffer und zuunterst die Liposomen in 1,2 M Sucrose in H₂O. Das Volumen des Gradienten beträgt maximal 4,5 ml. Die Flotation erfolgt bei Raumtemperatur für 45 min bei 50.000 rpm in einer Ultrazentrifuge. Die Liposomen, welche sich zwischen der 0,8 M Sucrose- und der Pufferschicht befinden, werden abgenommen.

RNA-Mengenbestimmung mit Ribo Green RNA Quantitation Reagenz

Der Assay wird im Endvolumen von 200 µl durchgeführt. Zuerst fertigt man eine Eichreihe der siRNA zwischen 1 ng und 10 ng an (10-100 µl 100 ng/ml siRNA).

Das Ribo Green verdünnt man 1:2000 in TE-Puffer. Zu jedem Ansatz werden 100 µl Ribo Green zugegeben, dann inkubiert man 5 min bei Raumtemperatur und misst die Fluoreszenz bei 485/520 nm. Die Ansätze werden mit je 4 µl 10 % Triton (Endkonzentration 0,2 mM) versetzt. Diese Eichkurve dient später für die Bestimmung der in Liposomen eingeschlossenen Menge an siRNA. Nach ca. 15 min misst man noch einmal die Fluoreszenz. Die Ergebnisse werden graphisch in ein Diagramm eingetragen (je eine Kurve mit und ohne Triton) und Eichgeraden mit den dazu gehörigen Gleichungen aus den Werten generiert.

Die Liposomen verdünnt man in zwei verschiedenen Konzentrationen (z.B. 1:50 und 1:100) und misst 2-3 verschiedene Volumina der Verdünnungen (z.B. 5, 10 und 15 µl der Verdünnungen ad 100 µl TE plus 100 µl Ribo Green Reagenz).

ohne und mit Triton. Die errechnete Konzentration der siRNA einer Formulierung muss bei den verschiedenen Messungen in etwa übereinstimmen. Ist dies nicht der Fall, lag man mit der siRNA-Menge außerhalb der Eichkurven und sollte diese Werte nicht in die Berechnung der Konzentration einfließen lassen. Die Effizienz, mit siRNA in verschiedenen Formulierung eingeschlossen werden konnte zeigt die Tabelle X.

Tabelle 2: Einschluss siRNA antiGFP in amphotere Liposomen

Formulierung	Zusammensetzungen	Effizienz
POPC/MoChol/Chems/Chol	50:10:30:10	8,7%
DMPC/HistDG/Chol	50:10:40	8,7%
DMPC/MoChol/DGSucc/Chol	20:10:30:40	6,1%
DMPC/DOTAP/DGSucc/Chol	20:10:30:40	20,5%
DMPC/HistChol/Chol	50:10:40	56,4%
POPC/MOChol/DPPS/Chol	40:10:10:40	58,4%
POPC/MoChol/DGSucc/Chol	20:10:30:40	8,1%
DMPC/MOChol/DGSucc/Chol	35:10:15:40	21%
POPC/MoChol/DGSucc/Chol	35:10:15:40	16,8%
DMPC/AC/Chol	50:10:40	30,4%
DMPC/HisChol/DPPS/Chol	35:10:15:40	30,1%
DMPC/isoHistSuccDG/Chol	50:10:40	21,1%
DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol	40:10:10:40	49%
DMPC/HisChol/DPPS/Chol	35:10:15:40	46%

10

Test von siRNA-haltigen Liposomen im Serum

Unmodifizierte siRNA wird im Serum sehr schnell abgebaut. Um den schützenden Effekt der Liposomen auf die siRNA zu untersuchen, wird wie im folgenden dargestellt vorgegangen.

Die Konzentration der eingeschlossenen siRNA wird vor dem Serumtest bestimmt. Für jeden zu testenden Zeitpunkt werden Liposomen mit je 4 µg siRNA pro Zeitpunkt eingesetzt. Getestete Zeitpunkte: Null, 1 h, 2 h und 4 h.

Die Liposomen mit 4 µg siRNA im Innern werden auf 60 µl Volumen verdünnt mit dem Puffer, in welchem sich die Liposomen befinden (üblicherweise 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5). Zu den Ansätzen werden 60 µl Serum zugegeben und bis zu den entsprechenden Zeitpunkte bei 37 °C inkubiert. Der Nullzeitpunkt wird separat bestimmt.

Eine Phenol/Chloroform-Extraktion wird mit PLG-Eppis (Phase-Lock-Gel-Eppendorfröhrchen) durchgeführt für eine gute Trennung der

Lichtintensität). Die siRNA bleibt gefärbt, wohingegen sich der Hintergrund wieder völlig entfärbt wird.

DMPC/AC/Chol

50:10:40 hat.

Deutsche Patentanmeldung - Serumstabile amphotere Liposomen

8. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/HisChol/DPFS/Chol 35:10:15:40 hat.
- 5 9. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/IsohistsuccDG/Chol 50:10:40 hat.
- 10 10. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/MoChol/DGSucc/Chol 35:10:15:40 hat.
11. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/MoChol/DGSucc/Chol 40:10:10:40 hat.
12. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/MoChol/DGSucc/Chol 35:10:15:40 hat.
- 20 13. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/Hist-DG/Chol 50:10:40 hat.
- 25 14. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/MoChol/DPFS/Chol 40:10:10:40 hat.
- 30 15. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/DOTAP/DG-Succ/Chol 20:10:30:40 hat.
16. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HistChol/Chol 50:10:40 hat.
- 35 17. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HistDG/Chol 40:20:40 hat.

POPC/HisChol/Chems/Chol 40:10:10:40 hat.

5

Serumstabile amphotere Liposomen

10

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft amphotere liposomale Formulierungen, die besondere Serumstabilität zeigen und sich zum intrazellulären Delivery von Oligonukleotiden eignen.

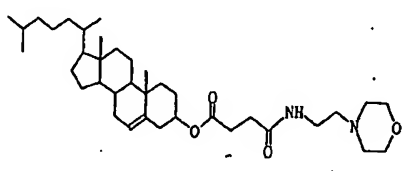
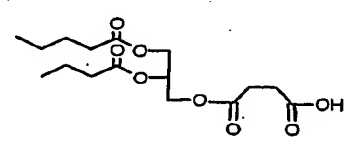
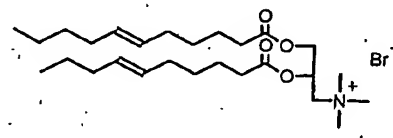
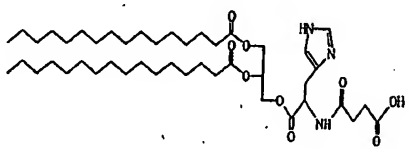
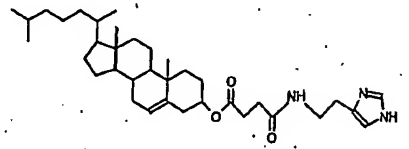
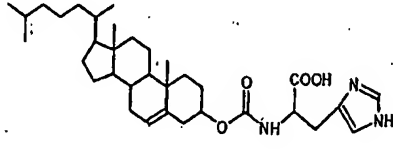
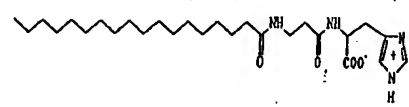
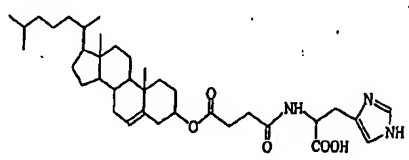
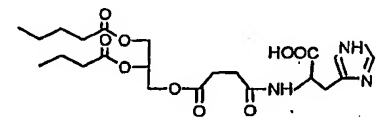


Deutsche Patentanmeldung - Serumstabile amphotere Liposomen.

Tabelle 1

Nr	Lipidmischung	Verhältnis	Serumstabilität	Nr	Lipidmischung	Verhältnis	Serumstabilität
26	DMPC/MoChol/DMPS/Chol	40:10:10:40	+	HC10A	DPFC/MoChol/Chol	50:15:35	+
12	DMPC/AC/Chol	50:10:40	+	SC1Ea	POPC/HisChol/Chems	60:20:20	-
13	DMPC/HisChol/DPPS/Chol	35:10:15:40	+	SC1E	POPC/HisChol/Chems	50:15:35	-
15	DMPC/IsohistSuccDG/Chol	50:10:40	+	HC1Eb	DPFC/HisChol/Chems	60:20:20	-
09	DMPC/MoChol/DGSucc/Chol	35:10:15:40	+	HC39	DPFC/DGSucc/Chems	50:15:35	-
10	DMPC/MoChol/DGSucc/Chol	40:10:10:40	+	SC7B	POPC/HistPS/Chol	50:15:35	+
11	POPC/MoChol/DGSucc/Chol	35:10:15:40	+	S7B	POPC/HistPS	60:40	-
05	DMPC/HistChol/Chol	50:10:40	+	HC7B	DPFC/HistPS/Chol	50:15:35	+
07	POPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40	+	S7B	DPFC/HistPS	60:40	-
02	DMPC/Hist-DG/Chol	50:10:40	+	SC3C	POPC/MoChol/Chems	50:15:35	-
03	DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40	+	HC3C	DPFC/MoChol/Chems	50:15:35	-
06	POPC/MoChol/DPPS/Chol	40:10:10:40	+	SC19B	DPFC/DOTAP/Chems	50:15:35	-
2a	DPFC/DOTAP/DG-Succ/Chol	20:10:30:40	+	SC6	POPC/AC/Chol	50:15:35	+
3a	DPFC/HistChol/Chol	50:10:40	+	S6	POPC/AC	60:40	-
4a	DPFC/HistDG/Chol	40:20:40	+	HC6	DPFC/AC/Chol	50:15:35	+
7a	DPFC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40	+	H6	DPFC/AC	60:40	-
4	DMPC/DOTAP/DG-Succ/Chol	29:14:43:14	-	HC12	DPFC/CHIM/Chems	50:15:35	-
1	DPFC/DOTAP/Chems/Chol	50:10:30:10	-	SC12	POPC/CHIM/Chems	50:15:35	-
X	DPFC/DOTAP/Chems	60:10:30	-	H34	DPFC/HistSuccDG	60:40	-
Y	POPC/DOTAP/Chems	60:10:30	-	S5	POPC/HistChol	60:40	-
6	DPFC/MoChol/Chems/Chol	50:10:30:10	-	SC34	POPC/HistSuccDG/Chol	50:15:35	+
SC10A	POPC/MoChol/Chol	50:15:35	+	HC35	DPFC/IsoHistSuccDG/Chol	50:15:35	+
HC5	DPFC/HistChol/Chol	50:15:35	+	SC35	POPC/IsoHistSuccDG/Chol	50:15:35	+
SC5	POPC/HistChol/Chol	50:15:35	+	HC34	DPFC/HistSucc/Chol	50:15:35	+

Figur 1
Abkürzungen und chemische Formeln verwendeter Lipide

<p>MoChol</p> 	<p>DG-Succ</p> 
<p>DOTAP</p> 	<p>IsohistsuccDG</p> 
<p>HisChol</p> 	<p>HCChol</p> 
<p>AC</p> 	
<p>Ist-Chol</p> 	
<p>Hist-DG</p> 	

4 05 11 04

Deutsche Patentanmeldung - Serumstabile amphotere Liposomen

26

Figure 2
Pipetierschema für den Serumtest

	Puffer				Serum							
	1 Basis	2 Triton	3 Basis	4 Triton	5 Basis	6 Triton	7 Basis	8 Triton	9 Basis	10 Triton	11 Basis	12 Triton
A t=null	For- mulie-		For- mulie-		For- mulie-		For- mulie-		For- mulie-			
B t=null	rung 1		rung 2				rung 1		rung 2			
G-C		Analog	den	anderen	Zeilen							
H t=24h												

5

405.104

27

Deutsche Patentanmeldung - Serumstabile amphotere Liposomen

Abbildung 3

